

过量表达 *AtNHXS1* 新基因 显著提高水稻的耐盐性

黑倩¹ 张辉¹ 黄继斌¹ 郭力榕¹ 徐源¹ 李建粤² 夏涛¹

1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; 2. 上海师范大学生命科学学院, 上海 200235

摘要 以转基因和野生型水稻为材料, 通过农杆菌介导法将 *AtNHXS1* 转到水稻植株中花 11 号中, 分析在盐胁迫下 Na^+ 、 K^+ 含量的变化, 对两者耐盐性进行比较, 并对转基因株系进行分子鉴定和转录表达分析。结果表明: PCR 初步鉴定得到了 20 个转基因株系, 随机挑选 2 个 PCR 阳性株系进行 Southern blot 鉴定, 确定 *AtNHXS1* 以单拷贝的形式成功插入到水稻基因组中。耐盐性分析表明, 在盐胁迫条件下, 转基因水稻植株的生长状况、干质量、鲜质量、 Na^+ 含量显著优于或高于野生型水稻植株; 此外, 300 mmol/L NaCl 处理下, 转基因水稻植株能够正常存活, 而野生型水稻 5 d 内几乎全部死亡。将 300 mmol/L NaCl 处理过的植株在无盐胁迫的条件下进行恢复生长试验, 转基因植株 10 d 内恢复正常, 而野生型则不能。过量表达改组后的 *AtNHXS1* 新基因显著提高了水稻的耐盐性。

关键词 *AtNHXS1*; DNA 改组技术; 转基因水稻; 耐盐性; 盐胁迫

中图分类号 S 511; Q 943.2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)05-0529-07

盐胁迫是影响农作物产量的重要非生物胁迫因子之一^[1-4], 它主要通过离子毒害和渗透胁迫 2 种方式对植物造成伤害^[5]。植物为适应盐胁迫, 形成了一系列的抗逆机制, 主要包括 Na^+ 外排、 Na^+ 的区隔化以及降低 Na^+ 的吸收^[6]。植物液泡膜上的 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白将 Na^+ 区隔到液泡中, 既降低细胞质中 Na^+ 的含量, 也调节了细胞渗透势, 是一种经济高效的维持 Na^+ 均衡的方式, 因此在植物抵御盐胁迫中发挥了重要的作用^[5]。植物液泡膜上的 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白活性首次在红甜菜贮藏组织中发现^[7], 目前已经从很多植物中克隆得到 Na^+ / H^+ 逆向转运基因并且证明了转该基因可以明显提高植物耐盐性。Apse 等^[1] 在拟南芥中, Zhang 等^[8] 在番茄中过量表达来自拟南芥的 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1*, 植株均能在 200 mmol/L NaCl 胁迫下正常生长、开花结实; 此外还发现, 过量表达 *AtNHX1* 提高了转基因玉米和小麦的耐盐性^[9]。在实际生产应用过程中, 目前已克隆的逆向转运蛋白还存在活性不高和离子交换能力不强等问题, 制约了该基因的应用和推广, 因此, 如

何利用分子生物学技术提高 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白基因的活性是应用推广该基因和培育转基因耐盐植物的关键。

DNA 改组(DNA shuffling)技术是一种高效的分子定向进化技术。通过体外改组技术改变原有基因的核酸序列, 可以创造新的功能更强的基因^[10-11]。DNA 改组技术已经在改造工业酶活性、药物蛋白等领域取得一定成果^[12-13], 但利用该技术对 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白基因进行优化的研究尚处于起步阶段。笔者所在实验室通过 DNA shuffling 技术对拟南芥 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1* 进行基因改组, 得到了活性显著提高的新型 Na^+ / H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHXS1*, 酵母互补试验表明该基因表达的逆向转运蛋白比野生型拟南芥中该蛋白的盐耐受性提高了 1 倍^[14]。水稻(*Oryza sativa* L.) 作为世界上最重要的粮食作物之一, 土壤的盐渍化严重限制了它的种植范围和产量。迄今, 在耐盐育种方面, 将植物基因工程与 DNA shuffling 技术结合在一起的研究尚属空白。笔者利用所在实验室通过 DNA shuffling 技术获得的活性显著提高的新型

收稿日期: 2011-03-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(3067336)和上海市教育委员会科研创新基金项目(11ZZ40)

黑倩, 硕士研究生, 研究方向: 植物基因工程. E-mail: 51081300077@ecnu.cn

通讯作者: 夏涛, 博士, 教授, 研究方向: 植物基因工程. E-mail: txia@bio.ecnu.edu.cn

Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白基因 *AtNHXS1* 进行转基因水稻研究,以实际评价该基因在耐盐性方面的表现。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种中花 11 号。大肠杆菌菌种 (*Escherichia coli*) DH5 α , 根瘤农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciense*) EHA105, 植物表达载体 pCAMBIA1301-35SN 均为笔者所在实验室保存。DNA 回收试剂盒购自 Promega 公司; SYBR[®] PrimeScript[™] RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)、Taq DNA 聚合酶、DNA Marker DL2000、限制性内切酶均购于 TaKaRa (大连) 公司; DIG high primer DNA labeling and detection starter kit I 为 Roche 产品; 其他药品、试剂均为分析纯。

1.2 试验方法

1) 植物表达载体 pCAMBIA1301-35SN-*AtNHXS1* 的构建。Sma I 和 Sal I 对 *AtNHXS1* 及植物表达载体进行双酶切, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳回收纯化, 16 °C 过夜连接, 将构建的重组质粒 pCAMBIA1301-35SN-*AtNHXS1* 转化到大肠杆菌 DH5 α , 对获得的重组质粒进行酶切, PCR 鉴定。

2) 水稻的遗传转化。将构建好的载体转入到超毒力农杆菌 EHA105 中, 用于水稻的遗传转化。水稻成熟种子去颖, 70% 乙醇浸泡 1 min 后, 用体积比为 1:2 的次氯酸钠溶液消毒 30 min, 无菌水冲洗 7~8 次, 然后 26 °C 条件下无菌水浸泡过夜。将胚切下放置在 N₆ D₂ [15] 培养基上 (含 1 mg/L 2, 4-D, pH 5.8), 26 °C 暗培养。14 d 继代 1 次, 共 2 次, 选取致密的生长状态良好愈伤组织颗粒用于侵染。将含有 pCAMBIA1301-35SN-*AtNHXS1* 的农杆菌接种到 AB 液体培养基 (50 mg/L 卡那霉素、20 mg/L 利福平), 28 °C 震荡培养, 菌液浓度调节至 D 值为 0.3~0.5, 5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 重悬于 100 mL AAM [16] 液体培养基 (20 mg/L 乙酰丁香酮 AS) 中, 浸泡胚性愈伤组织 20 min, 放在无菌滤纸上将菌液吸干, 转入共培养培养基中, 22 °C 下共培养 3 d; 然后转移到筛选培养基上筛选, 每 2 周继代 1 次, 继代 2 次后转移到预分化培养基上培养约 1 周, 愈伤状态转好后接入分化培养基中分化生苗。当抗性苗高度达到 2~3 cm 后, 将其移至生根培养基 (含 1 mg/L NAA 的 MS 培养基) 中, 待其根系发

达后进行炼苗移栽。

3) 转 *AtNHXS1* 水稻分子检测。以 CTAB 法提取转基因和野生型植株水稻叶片的全基因组 DNA 为模板, 根据 *AtNHXS1* 序列设计引物, F: 5'-CGAGTCGACATGTTGGATTCTCTAGTG-3' (划线处为 Sal I 酶切位点); R: 5'-ATA CCCGGG-AGCCTTACTAAGATCAG-3' (划线处为 Sma I 酶切位点) 进行 PCR 检测。PCR 反应程序为: 94 °C 10 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

将通过 PCR 筛选出的阳性转基因水稻株系 AT-7 和 AT-10 进行 Southern blot 试验鉴定。设计引物 F: 5'-TTCTCTAGTGTCGAAACTGCC-3' R: 5-TGTTGCAGCAAATATGGCACC-3', 以质粒 pCAMBIA1301-35SN-*AtNHXS1* 为模板, 扩增 *AtNHXS1* 部分片段为探针。通过 BamH I 酶切水稻基因组全 DNA, 电泳转膜, 参照地高辛标记及其检测试剂盒进行 Southern blot 检测。

4) 荧光定量 PCR 分析。取 3 周大小、长势相似的 T₂ 代野生型和转基因水稻, 前者用不含盐的 Hoagland 营养液处理 5 d, 后者分别用含 0、100、150 mmol/L NaCl 的 Hoagland 营养液处理 5 d, 处理好的试验材料将用于 RT-PCR 检测。本次试验一方面以野生型水稻为对照, 判断非盐胁迫下 *AtNHXS1* 在转基因水稻中的表达情况; 另一方面以 0 mmol/L NaCl 处理的转基因水稻为对照, 判断不同盐浓度下 *AtNHXS1* 的表达变化情况。Trizol 法提取不同盐处理下水稻叶片总 RNA, 参照 Takara 公司说明书反转录得到 cDNA, 以水稻内源 *β -actin* (GenBank: NM-197297) 作为内参基因, 通过相对定量法确定目的基因 *AtNHXS1* 表达量的相对差异。分别对 2 个基因设计引物: *β -actin*: F: 5'-CCTCGGAGCGTG GTTAC-3', R: 5-CAGGGCAGCG-GAAACG-3'; *AtNHXS1*: F: 5'-A CTCACCTAAAC-CACGA A GC-3', R: 5-GAGGATACCGCTCAAGTCG-3'。RT-PCR 程序: 94 °C 5 min, 94 °C 15 s, 54 °C 10 s, 72 °C 15 s (读板), 40 个循环。

5) 转基因水稻苗期耐盐性分析。以培养 3 周左右的 T₂ 代野生型及其 AT-7、AT-10 转基因株系为试验材料, 分别在含 0、50、100、150、200 mmol/L NaCl 的 Hoagland 营养液中培养 10 d; 此外将材料在 300 mmol/L NaCl 高盐溶液的 Hoagland 培养液

中培养 5 d, 培养方式从 50 mmol/L NaCl 培养液起, 盐浓度逐渐增加, 每次增加 50 mmol/L, 3 d 处理 1 次, 最终用终浓度 300 mmol/L NaCl 处理 5 d 后撤去盐处理, 在无盐胁迫条件下恢复生长 10 d。分别观察不同浓度盐处理下转基因植株和野生型植株的生长状态。

6) 水稻植株干质量和鲜质量测量。取生长 3 周大小和长势相似的 T₂ 代野生型及其 AT-7、AT-10 转基因水稻幼苗, 分别在 0、150 mmol/L NaCl 下处理 7 d, 用于干质量和鲜质量的测量。用蒸馏水将植株全苗冲洗干净, 用吸水纸吸干表面水分, 称取鲜质量, 之后转入烘箱 120 °C 杀青 30 min, 80 °C 烘干至恒质量, 称取干质量。

7) Na⁺、K⁺ 含量的测定。取生长 2 周的 T₂ 代野生型和 AT-7、AT-10 转基因水稻幼苗, 分别在 0、120 mmol/L NaCl 浓度下处理 5 d。将处理后的植株全苗用去离子水冲洗 5 遍, 90 °C 烘干至恒质量,

并记录植株干质量。用 0.1 mol/L 的醋酸作为处理液, 沸水浴处理 3 h, 离心取上清, 使用原子吸收分光光度计(AA-680, Shimadzu, Japan)分别测定野生型及转基因植株的 Na⁺、K⁺ 含量。试验中所有数据为 3 次重复的平均值 ± 标准误。

2 结果和分析

2.1 植物表达载体 pCAMBIA1301-35SN-*AtNHXS1* 的构建

表达载体 pCAMBIA1301-35SN 通过 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子替换 pCAMBIA1301 载体中的多克隆位点构建。采用 *Sma*I 和 *Sal*I 分别对 *AtNHXS1* 和表达载体进行双酶切, 过夜连接, 得到植物表达载体 pCAMBIA1301-35SN-*AtNHXS1* (图 1)。PCR 及其测序结果显示, *AtNHXS1* 的开放式阅读框正确插入到 CaMV35S 启动子和 Nos 终止子之间。

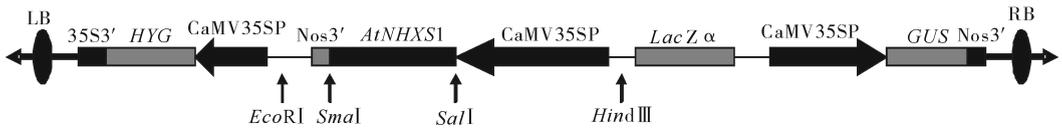
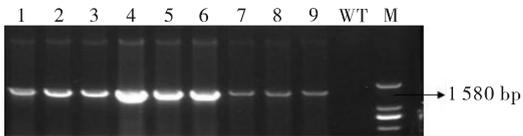


图 1 植物表达载体 pCAMBIA1301-35SN-*AtNHXS1* 结构图

Fig. 1 Diagram of the expression vector pCAMBIA1301-35SN-*AtNHXS1*

2.2 转基因水稻株系的获得及其分子鉴定

通过农杆菌介导法成功地将 CaMV35S 启动的 *AtNHXS1* 转入到水稻品种中花 11 号中。通过 PCR 检测(图 2), 初步确定得到了 20 个独立的转基因株系。对其中 2 个 PCR 阳性株系 AT-7、AT-10 进行 Southern blot 鉴定, 确定 *AtNHXS1* 以单拷贝形式成功地插入到水稻基因组(图 3), AT-7、AT-10 2 个水稻株系用于下一步耐盐性试验。

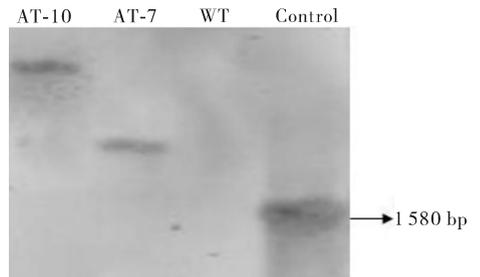


M: DNA 分子质量标准 DL 2 000 marker;
WT: 野生型水稻 Wild-type plants;
1~9: 转基因水稻 Transgenic plants.

图 2 转 *AtNHXS1* 水稻 PCR 鉴定电泳图

Fig. 2 PCR identification of *AtNHXS1*

in transgenic rice plants



Control: PCR 扩增产物 PCR products of *AtNHXS1*; WT: 野生型水稻 Wild-type plants; AT-7, AT-10: 转基因水稻 Transgenic plants.

图 3 转 *AtNHXS1* 水稻植株 Southern blot 鉴定

Fig. 3 Southern blot analysis of *AtNHXS1* transgenic rice plants

2.3 转基因植株 RT-PCR 分析

通过 RT-PCR 技术, 分析在盐胁迫下转基因植株中 *AtNHXS1* 表达情况。试验结果(表 1, 表 2)显示, 在正常生长状态下, 转基因水稻 *AtNHXS1* 的表达量为野生型的 39.12 倍, 说明 *AtNHXS1* 在

转基因水稻中为过量表达。转基因水稻不同盐浓度处理下,内参基因 $\beta actin$ 表达稳定,但是 $AtNHXS1$ 基因的转录水平即 RNA 表达量明显的增加,并且随着盐浓度的提高,基因表达量也相应

增加。与无盐胁迫下 RNA 表达量相比,100 mmol/L NaCl 下, RNA 表达量提高了 1.46 倍;而在 150 mmol/L NaCl 下, RNA 表达量提高了 2.49 倍。

表 1 荧光定量 PCR 分析 $AtNHXS1$ 在转基因水稻中的过量表达¹⁾

Table 1 The relative quantitative expression of $AtNHXS1$ overexpression in transgenic rice plants

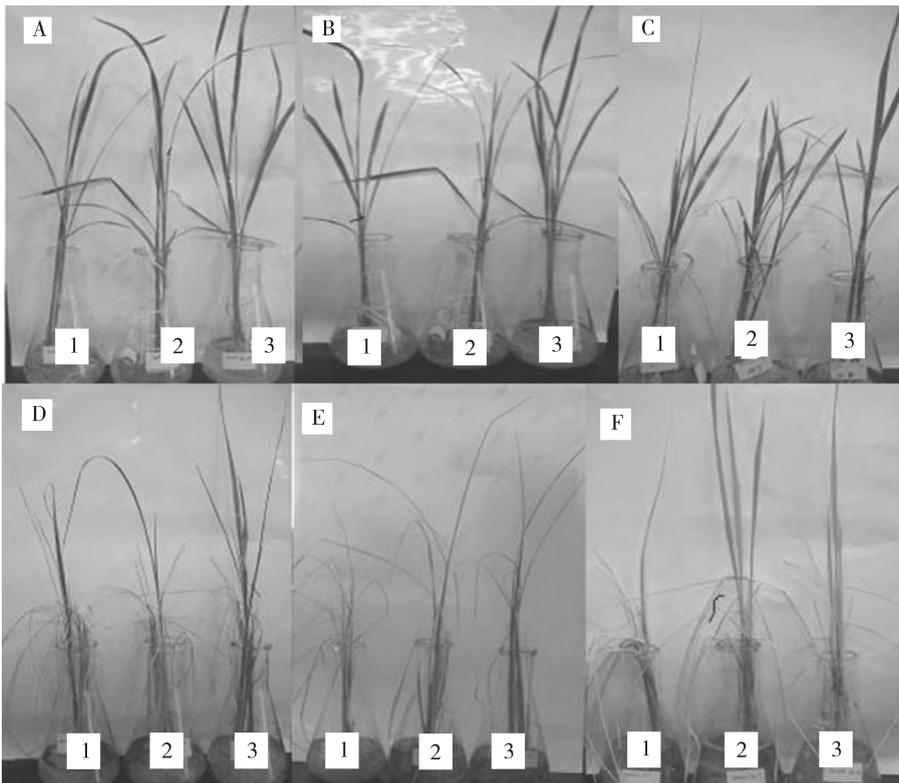
类型 Type	内参基因 Ct 值 $Ct(\beta actin)$	目的基因 Ct 值 $Ct(AtNHXS1)$	Ct 值差 ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	比率 Ratio
野生型 Wild-type	25.34±0.14	30.25±0.11	4.91±0.18	/	1.00
转基因型 Transgenic	25.61±0.16	25.23±0.19	-0.38±0.25	-5.29±0.30	39.12

1) $\Delta Ct = \text{目的基因的 Ct 值} - \text{内参基因的 Ct 值}$; $\Delta\Delta Ct = \text{NaCl 盐处理后(目的基因的 Ct 值} - \text{内参基因的 Ct 值)} - \text{未处理组(目的基因的 Ct 值} - \text{内参基因的 Ct 值)}$ 。 $\Delta Ct = (Ct, AtNHXS1 - Ct, \beta actin)$; $\Delta\Delta Ct = (Ct, AtNHXS1 - Ct, \beta actin) \text{ NaCl treatment} - (Ct, AtNHXS1 - Ct, \beta actin) \text{ control}$ 。下同 The same as below.

表 2 荧光定量 PCR 分析不同盐浓度胁迫下 T_2 转基因水稻

Table 2 The $AtNHXS1$ expression of transgenic plants under different NaCl treatment by RT-PCR

NaCl 处理浓度/(mmol/L) NaCl treatment	目的基因 Ct 值 $Ct(AtNHXS1)$	内参基因 Ct 值 $Ct(\beta actin)$	Ct 值差 ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	比率 Ratio
0	19.37±0.05	25.26±0.02	-5.89±0.05	/	1.00
100	18.59±0.07	25.02±0.02	-6.43±0.07	-0.54	1.46
150	18.12±0.06	25.33±0.04	-7.21±0.07	-1.32	2.49



1:野生型水稻 The wild-type cultivar; 2,3:转基因植株 The transgenic plants; A. 0 mmol/L NaCl 处理 10 d Under 0 mmol/L NaCl for 10 days; B. 50 mmol/L NaCl 处理 10 d Under 50 mmol/L NaCl for 10 days; C. 100 mmol/L NaCl 处理 10 d Under 100 mmol/L NaCl for 10 days; D. 200 mmol/L NaCl 处理 10 d Under 200 mmol/L NaCl for 10 days; E. 300 mmol/L NaCl 处理 5 d Under 300 mmol/L NaCl for 5 days; F. 撤去 300 mmol/L NaCl 处理后恢复 10 d After 300 mmol/L NaCl treatment then transferred to 0 mmol/L NaCl for 10 days.

图 4 野生型和转基因水稻耐盐性分析

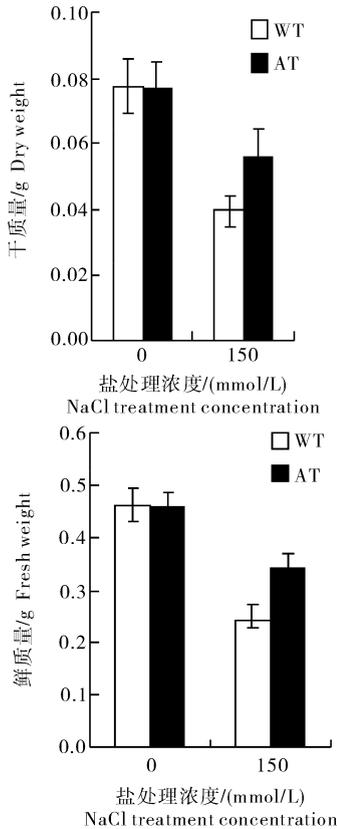
Fig. 4 The growth of wild-type and transgenic rice plants under salt treatment

2.4 转基因水稻耐盐性分析

正常生长状态下,转基因水稻植株 AT-7、AT-10 和野生型植株之间没有明显的生长差异(图 4-A),但是随着盐浓度的提高,转基因水稻表现出越来越明显的生长优势(图 4-B,C)。当盐浓度达到 200 mmol/L NaCl 时,转基因水稻的长势已明显优于野生型水稻(图 4-D),在 300 mmol/L NaCl 处理条件下,野生型植株叶子全部变黄并卷曲死亡,转基因植株叶尖出现卷曲变黄,叶子部分变白,但是茎秆为绿色(图 4-E)。去除盐胁迫,在无盐的 Hoagland 营养液中进行恢复试验,转基因植株 10 d 后便恢复正常生长,但野生型植株不能恢复生长(图 4-F)。结果表明,*AtNHXS1* 的转入明显提高了水稻的耐盐性。

2.5 转基因水稻生理生化指标分析

对 3 周左右的水稻单株进行干质量和鲜质量测定,结果显示,无盐胁迫的状况下,转 *AtNHXS1* 基因水稻植株和野生型植株无显著差异。但在 150 mmol/L NaCl 处理条件下,野生型植株的干质量和



WT:野生型水稻 Wild-type plants; AT:转基因水稻 Transgenic plants; 下同 The same as below.

图 5 野生型、转基因水稻的干质量和鲜质量
Fig. 5 The dry/fresh weight between wild-type and transgenic plants

鲜质量均明显下降,转基因植株各项指标也有小幅下降,但明显高于野生型植株(图 5)。

2.6 植株 Na⁺、K⁺ 含量的测定

对 2 周左右的水稻单株进行 Na⁺、K⁺ 含量测定,结果显示,盐处理前转基因植株和野生型植株 Na⁺、K⁺ 含量无显著差异;在 120 mmol/L NaCl 处理条件下,转基因植株中 Na⁺ 含量约是野生型植株 Na⁺ 含量的 1.3 倍,转基因植株中 K⁺ 含量略低于野生型植株(图 6)。

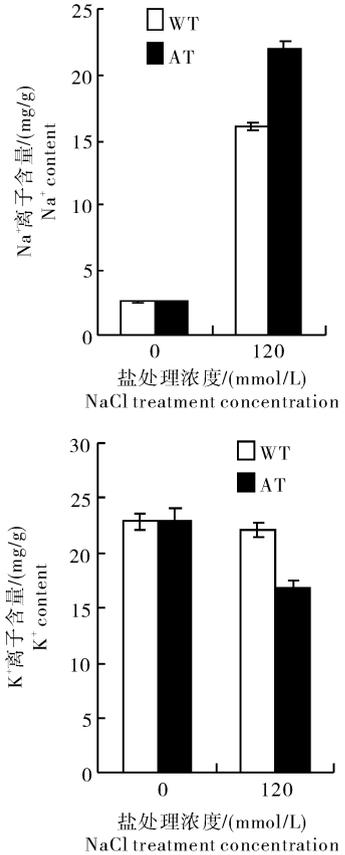


图 6 野生型、转基因水稻的 Na⁺、K⁺ 含量

Fig. 6 The Na⁺, K⁺ contents between wild-type and transgenic plants

3 讨论

水稻对盐害非常敏感,盐渍化土壤非常不利于水稻的生长,常常造成水稻产量下降,甚至死亡。近年来,利用基因工程技术培育耐盐性转基因水稻已经取得了一定的成果。研究表明,过量表达 *OsNHX1* 基因,水稻可以在 200 mmol/L NaCl 下存活^[17],转 *nhaA* 水稻可以在 150 mmol/L NaCl 胁迫下生长^[18]。在本研究中笔者利用所在实验室通

过 DNA shuffling 技术获得的新型 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHXS1* 对水稻进行遗传转化, 获得的转 *AtNHXS1* 水稻在 200 mmol/L NaCl 下可以正常生长, 在 300 mmol/L NaCl 高盐条件处理 5 d 后转基因水稻仍然可以存活, 而野生型水稻几乎全部死亡。撤去 300 mmol/L NaCl 处理后, 10 d 内转基因水稻可以恢复正常生长, 但是野生型水稻却无法恢复生长。笔者所在实验室先前将 *AtNHXS1* 转入酵母中, 使酵母的耐受性有显著提高^[14], 这些结果都表明改组后获得的新基因 *AtNHXS1* 具有更好的盐耐受性。

目前, Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的表达机制和调控途径还没被完全解读, 大多数研究集中在拟南芥 *AtNHX1* 的启动子方面。Gaxiola 等^[19] 的研究表明 *AtNHX1* 基因为组成型表达模式, Shi 等^[20] 发现 NaCl、KCl、ABA 能够上位调节 *AtNHX1* 的转录表达水平。本试验中通过对含组成型 35S 启动子的 *AtNHXS1* 进行转录水平的研究, 表明 *AtNHXS1* 在转基因水稻中正常表达, 基因表达量在转录水平上受到 NaCl 的调节, 这些结论和前人研究成果一致。由于本研究中使用的是组成型启动子, 由此推测在盐胁迫的情况下, 基因的表达量可能是受到多个相关元件的调节, 是多层次多因子的共同作用, 但是本研究中关于不同组织中基因表达量的变化只是初步的证实, 与该基因有关的具体调控机制还有待进一步的研究。

我们的研究还发现, 将改组 *AtNHX1* 基因获得的 *AtNHXS1* 转入水稻后, 植株具有更强的 Na^+ 富集能力。类似的, Apse 等^[1] 将 *AtNHX1* 转入拟南芥中, 在 200 mmol/L NaCl 处理 16 d 后, 发现植株地上部分 Na^+ 含量显著提高。以上结果均表明, 通过增强植物对过量 Na^+ 在液泡中的富集能力能显著提高其耐盐性。转 *AtNHXS1* 水稻比野生型植株有更强的 Na^+ 富集能力, 避免了过量 Na^+ 对细胞的毒害, 同时增强了细胞的渗透压, 减轻了离子毒害对植物带来的过氧化胁迫, 从而增强植物的耐盐性。Zhang 等^[8] 发现 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白具有调节 K^+/H^+ 交换的功能。环境中 K^+ 浓度较低时, 液泡中 K^+ 浓度降低, 而细胞质中 K^+ 浓度保持相对稳定。Fukuda 等^[21] 将 *OsNHX1* 转入水稻中, 植物中 K^+ 含量下降, 推测 Na^+ 可能通过 K^+ 通道进入细胞中^[22], NaCl 浓度较高时, Na^+ 可以竞争性的与植物细胞上的 K^+ 运输通道结合^[22-23]。本研究中, 在

盐胁迫的条件下, 转 *AtNHXS1* 水稻比野生型水稻 Na^+ 含量提高, 而 K^+ 含量略有下降, 说明 *AtNHXS1* 蛋白在调节细胞中 Na^+ 浓度的同时对 K^+ 运输也有一定调节作用。进一步研究 *AtNHXS1* 的表达对 K^+ 运输相关基因和调控途径的影响, 将有利于揭示 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白对植物 K^+ 吸收的影响。

参 考 文 献

- [1] APSE M P, AHARON G S, SNEDDEN W A, et al. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis* [J]. *Science*, 1999, 285 (5431): 1256-1258.
- [2] 赵秀娟, 韩雅楠, 蔡禄. 盐胁迫对植物生理生化特性的影响[J]. *湖北农业科学*, 2011, 50(19): 3897-3899.
- [3] 张加强, 潘凤英, 廖小芳, 等. 红麻杂交种幼苗生长对盐胁迫的响应[J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(5): 552-557.
- [4] 陈玉梁, 裴怀弟, 石有太, 等. 温度和盐胁迫对油菜种子萌发及幼苗生长的影响[J]. *中国油料作物学报*, 2011, 33(4): 374-378.
- [5] BLUMWALD E, AHARON G S, APSE M P. Sodium transport in plant cells [J]. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, 2000, 1465: 140-151.
- [6] APSE M P, BLUMWALD E. Na^+ transport in plants [J]. *FEBS Letters*, 2007, 581: 2247-2254.
- [7] BLUMWALD E, POOLE R J. Na^+/H^+ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris* [J]. *Plant Physiol*, 1985, 78: 163-167.
- [8] ZHANG H X, BLUMWALD E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19: 765-768.
- [9] CHEN L H, ZHANG B, XU Z Q. Salt tolerance conferred by overexpression of *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* in common buckwheat (*Fagopyrum esculentum*) [J]. *Transgenic Research*, 2008, 17(1): 121-132.
- [10] STEMMER W P C. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling [J]. *Nature*, 1994, 370: 389-391.
- [11] 张小琼, 林拥军. 利用 DNA shuffling 技术构建含 5 个 *cry* 基因的突变体库以筛选高毒性杀虫蛋白 [J]. *华中农业大学学报*, 2011, 30(1): 13-17.
- [12] CRAMERI A, WHITEHOM E A, TATE E, et al. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling [J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 315-319.
- [13] CRAMERI A. DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution [J]. *Nature*, 1998, 391 (6664): 288-291.
- [14] XU K, ZHANG H, BLUMWALD E, et al. A novel plant Na^+/H^+ antiporter gene evolved by DNA shuffling confers improved salt tolerance in yeast [J]. *Journal of Biological Chemis-*

- try, 2010, 285:22999-23006.
- [15] ZHU Z Q, WANG J J, SUN J S, et al. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources [J]. *Science Sinica*, 1975, 18:659-668.
- [16] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA [J]. *Plant Journal*, 1994, 6:271-282.
- [17] FUKUDA A, NAKAMURA A, TAGIRI A, et al. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter from rice [J]. *Plant Cell Physiol*, 2004, 45:146-159.
- [18] WU L Q, FAN Z M, GUO L, et al. Over-expression of the bacterial *nhaA* gene in rice enhances salt and drought tolerance [J]. *Plant Science*, 2005, 168:297-302.
- [19] GAXIOLA R A, RAO R, SHEMAN A, et al. The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, *AtNhx1* and *Avp1*, can function in cation detoxification in yeast [J]. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(4):1480-1485.
- [20] SHI H Z, ZHU J K. Regulation of expression of the vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress and abscisic acid [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50:543-550.
- [21] FUKUDA A, CHIBA K, MAEDA M, et al. Effect of salt and osmotic stresses on the expression of genes for the vacuolar H^+ -pyrophosphatase, H^+ -ATPase subunit A, and Na^+/H^+ antiporter from barley [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55:585-594.
- [22] BLUMWALD E. Sodium transport and salt tolerance in plants [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2002, 12:431-434.
- [23] XUE Z Y, ZHI D Y, XUE G P, et al. Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf Na^+ [J]. *Plant Science*, 2004, 167:849-859.

Overexpression of a shuffled Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHXS1* improving salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.)

HEI Qian¹ ZHANG Hui¹ HUANG Ji-bin¹ GUO Li-rong¹
XU Yuan¹ LI Jian-yue² XIA Tao¹

1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;
2. School of Life Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200235, China

Abstract This study was to overexpress the *AtNHXS1*, a new vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene obtained from *AtNHX1* by DNA shuffling and study its effect on the salt tolerance of rice (*Oryza sativa* L.). *AtNHXS1* was transformed into *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. zhonghua11 by *Agrobacterium*-mediated method and confirmed by polymerase chain reaction (PCR) and Southern blot. The transcription level was analyzed by RT-PCR. The contents of Na^+ , K^+ and the ability of salt tolerance were compared between transgenic lines and wild-type lines. Twenty T_2 transgenic lines harboring *AtNHXS1* were obtained, two of which were verified as insertion of single gene by Southern blot. RT-PCR analyses showed that the expression levels of *AtNHXS1* mRNA were significantly higher after salt treatment in transgenic lines. After salt stress, it was found that the growth status, dry weight, fresh weight and Na^+ content of transgenic rice plants were significantly higher than those of wild-type plants, however the accumulation of K^+ was slightly low. Transgenic plants were able to survive and recover after exposure to 300 mmol/L NaCl for 5 days, whereas wild-type plants could not. These results demonstrated that overexpression of *AtNHXS1* significantly improved the salt tolerance of rice.

Key words *AtNHXS1*; DNA shuffling; transgenic rice; salt tolerance; salt stress